

ラット精巣特異的に発現する2つの新規有機アニオントランスポーター遺伝子の同定と解析

| | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 著者 | 鈴木 健弘 |
| 号 | 1829 |
| 発行年 | 2002 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/22272 |

| | |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名（本籍） | 鈴 ^{すず} 木 ^き 健 ^{たけ} 弘 ^{ひろ} |
| 学 位 の 種 類 | 博 士（医 学） |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 1 8 2 9 号 |
| 学位授与年月日 | 平 成 14 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研 究 科 専 攻 | 東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻 |
| 学 位 論 文 題 目 | Identification and characterization of two novel rat testis sepcific organic anion transporters （ラット精巣特異的に発現する 2 つの新規有機アニオン トランスポーター遺伝子の同定と解析） |
| 論文審査委員 | （主 査） 教授 伊 藤 貞 嘉 教授 岡 村 州 博 教授 渡 邊 建 彦 |

論文内容要旨

精巣に存在する精巣血液関門は精細管内の環境の恒常性を維持し、正常な精子形成を営む。その血液関門の機能の一つに細胞膜を介した選択的な物質の輸送機構がある。近年のこの機構の一翼を担う膜機能分子群として有機アニオントランスポーターに属する膜蛋白のいくつかが単離されてきている。我々の共同研究グループは以前、血液網膜関門が存在するラットの網膜より oatp2 と oatp3 の 2 種類の有機アニオントランスポーターを単離した。

今回、我々は血液精巣関門が存在する精巣に着目した。発現遺伝子のデータベースである GenBank database dbEST を既知の有機アニオントランスポータの塩基配列情報をもとにスクリーニングして 2 つの有機アニオントランスポーター相同のクローン (GenBank 登録番号 AL040464, AL042741) を得た。この 2 クローンを PCR 法を用いて増幅した遺伝子断片をプローブとして、40 万クローンからなるラット精巣 cDNA ライブラリーを hybridization 法を用いてスクリーニングし、2 つの新規有機アニオントランスポーターの cDNA を単離した。我々はこの 2 つのクローンを精巣特異的に発現するトランスポーターとして、TST (testis specific transporter)-1 及び TST-2 と名付けた。

TST-1, TST-2 はそれぞれ、748 及び 701 アミノ酸からなり、互いに 42% の相同性をアミノ酸レベルで有していた。TST-1 と TST-2 とともに他の既知の有機アニオントランスポーターとはアミノ酸レベルで 20 から 30% 程度の相同性を有しており、有機アニオントランスポーターの super gene family において新たな一群である可能性があった。

TST-1 及び TST-2 の cDNA クローンから合成した相補的 RNA をマイクロインジェクションし、これらの蛋白を発現させたアフリカルメガエル卵母細胞を用いた各種の放射性同位体標識の化学物質の取り込み実験で、TST-1 と TST-2 は共に taurocholic acid (以下 TCA) と dehydroepiandrosterone sulfate (以下 DHEAS) 及び thyroxine (以下 T4) を Michaelis-Menten の式に従い、基質の濃度依存性に飽和的に輸送することが判明した。さらに 10 μ M の [3 H]TCA に対して十倍濃度の各種基質で取り込みの阻害実験を行ったところ、TCA と DHEAS で特に有意の取り込み阻害を示した。

TST-1 と TST-2 発現の臓器分布を検索するため、ノザンプロット法による検討を行った。プローブは TST-1 と TST-2 とともに 3' 末端の非翻訳領域を含むそれぞれ、0.6 kb と 0.9 kb のものを用いた。TST-1, TST-2 とともに心臓、肝臓、肺、膵臓、脾臓、腎臓、骨格筋に発現は認められず、精巣のみにそれぞれ約 2.7 Kb と 2.5 kb のバンドが検出された。さらに、詳しい臓器分布の検索を進めるため、10 週齢の Sprague-Dawley ラット (以下 SD ラット) の精巣、精巣上体、卵巣、

副腎、及び生殖器が未成熟の3週齢SDラットの精巣、精巣上体、副腎より抽出した total RNA を用いてノザンブロット法を行った。ここで、TST-1は前回と同様のバンドが8週齢、3週齢とも精巣に検出され、さらに弱いながら、精巣上体、卵巣、副腎においても同バンドが検出された。TST-2では、精巣にのみ発現が認められ、かつ、2.5 kbに加えて、約7.5 kbと6 kbの新たなバンドが精巣にのみ検出された。

各臓器内での発現を組織学的に検討するため、ノザンブロットで使用したのと同部位のプローブを用いたジゴキシゲニン標識による *in situ* hybridization を行った。正常大人SDラットの精巣、精巣上体、卵巣と3週齢SDラット精巣の組織について検討を行ったところ、精巣においては、精祖細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞にシグナルが検出され、さらに弱く精母細胞にも発現が認められたが、精子には明らかな発現は認められなかった。精巣上体では上皮細胞において発現が認められた。卵巣においては、卵胞の顆粒層及び内卵胞膜細胞層と考えられる細胞にシグナルが観察された。3週齢の未熟な精巣では、精細管内の円形の細胞全般と間質に散在する細胞にシグナルが認められ、それぞれセルトリ細胞及びライディッヒ細胞と推測された。

以上のように、ラット精巣より単離された2つの新規有機アニオントランスポーターはTCA、抱合ステロイドのDHEASと甲状腺ホルモンを輸送し、その発現は精巣に強く限局的だが、精巣上体、卵巣にも発現していた。組織学的な発現の検討から、これらの新規トランスポーターが精巣血液関門での抱合ステロイドの輸送蛋白として機能することや、ステロイド合成における前駆体となる抱合ステロイドの細胞内取り込み機構を担う可能性が示唆された。さらに精子形成の開始前より、精巣の生殖細胞に発現することから、甲状腺ホルモンによる新生児期から性的成熟期にいたる精巣の発達制御に関与することも考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

精巣に存在する精巣血液関門は精細管内の環境の恒常性を維持し、正常な精子形成を営む。その血液関門の機能の一つに細胞膜を介した選択的な物質の輸送機構がある。近年、この機構の一翼を担う膜機能分子群として有機アニオントランスポーターに属する膜蛋白のいくつかが単離されてきている。

本研究では、ラット精巣 cDNA ライブラリーから 2 つの新規有機アニオントランスポーターの cDNA を単離、精巣特異的に発現するトランスポーターとして、TST (testis specific transporter) -1 及び TST-2 と名付けた。TST-1, TST-2 はそれぞれ、748 及び 701 アミノ酸からなり、互いに 42% の相同性をアミノ酸レベルで有していた。TST-1 と TST-2 とともに他の既知の有機アニオントランスポーターとはアミノ酸レベルで 20 から 30% 程度の相同性を有しており、有機アニオントランスポーターの super gene family において新たな一群である可能性があった。TST-1 及び TST-2 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験では、共に taurocholic acid (以下 TCA) と dehydroepiandrosterone sulfate (以下 DHEAS) 及び thyroxine (以下 T4) を Michaelis-Menten の式に従い、基質の濃度依存性に飽和的に輸送することが明らかとなった。また、これらトランスポーターの発現は精巣に強く限局的だが、精巣上体、卵巣にも発現していた。組織学的な発現の検討から、これらの新規トランスポーターが精巣血液関門での抱合ステロイドの輸送蛋白として機能することや、ステロイド合成における前駆体となる抱合ステロイドの細胞内取り込み機構を担う可能性が示唆される。さらに精子形成の開始前より、精巣の生殖細胞に発現することから、甲状腺ホルモンによる新生児期から性的成熟期に至る精巣の発達に制御に関与することも考えられた。

〈意義〉 本研究は精巣に発現する新規トランスポーターの発見とその機能を明らかにしている。科学的に優れた論文であり、十分学位に値する。